

Válaszok Dr. Szabados László bírálataira.

Szeretném megköszönni Dr. Szabados Lászlónak az opponensi munkát, a dolgozatom részletes értékelésére fordított idejét és fáradságát.

A dolgozat formai kivitelezése során elkövetett elírásokra, pontatlanságokra és következetlenségekre nincs mentség csupán elismerhetem a bírálók jogos kritikáját. A dolgozat készítése során az angol nyelvű cikkek "vissza fordítása" magyar nyelvre a vártnál nagyobb gondot okozott a szerzőnek. Ez azonban csak mentegetőzés és a legtöbb amit tehetek, hogy elnézést kérek a bírálóktól az elkövetett formai hibákért, amelyek megnehezítették a dolgozat olvasását, bírálatát.

Válaszok a bíráló szakmai megjegyzéseire és kérdéseire:

"...Az *in situ* felvételek inkább kvalitatív adatokat szolgáltatnak, mennyiségi különbségek kimutatására ez a módszer csak korlátozottan alkalmas...."

Tökéletesen egyet értek a bírálóval, hogy az *in situ* hibridizálás során kapott jelek esősorban kvalitatívak. Néhány esetben, más lehetőség híján, valóban vontunk le közelítő mennyiségi következtetéseket az *in situ* hibridizáció során kapott jelekből. Ezekben az esetekben, az *in situ* hibridizáció technológia során, a szignál kialakulás folyamatát különböző, egymást követő, időpontokban leállítottuk és a színreakció kialakulásának dinamikáját hasonlítottuk össze az azonos lemezen található különböző minták között. Ezt a bírálók elfogadták mint becslést a kvantitatív jellegre.

"... A dolgozatban vizsgálják a vírusfertőzés hatására a gazdanövényben kialakuló génexpressziós változásokat, jellemzik több gén szövetspecifikus expressziós mintázatának megváltozását. Ehhez kapcsolódva kérdezném, hogy végeztek-e genom szintű transzkript analízist, vannak-e adatok a vizsgált vírushajtók fertőzése során fellépő transzkriptációs változásokról? Ha igen, milyen általánosabb érvényű konklúziókat lehet ezekből levonni...."

A vírusfertőzés hatására bekövetkező génexpressziós változásokat elsősorban véletlenszerűen kiválasztott gének példáján mutattuk be. A kísérletek logikus folytatása lett volna a jelenség transzkriptom szintű vizsgálata. Azonban ezek a vizsgálatok pénzügyi okok miatt késtek. Laboratóriumunkban most készültek el az első microarray a vizsgálatok két shut-off jelenséget indukáló (CymRSV, crTMV) és egy nem indukáló (TCV) vírus felhasználásával.

A kísérletek során *N. benthamiana* növényeket fertőztünk a vírusokkal, majd a szisztémikus tüneteket mutató levelekből és a kontroll nem fertőzött levelekből készített RNS kivonatokat használunk fel a microarray kísérletekhez. Az adatok előzetes elemzése alátámasztotta azt a megfigyelést, hogy egyes vírusok rendkívül hatékonyan indukálnak változásokat a gazda génextpressziós rendszerébe, míg mások képesek azonos szinten replikálódni a növényben anélkül, hogy erősen interferálnának a gazda génextpressziójával. Ha csak azokat a géneket vesszük alapul, amelyek legalább 10x-es változást mutatnak a vírusfertőzés hatására a kontrollnövényhez képest akkor a shut-off indukáló vírusok közül a crTMV 1576 gén esetén indukál változást (amelyből 1261 mRNS kifejeződés gátlás, 315 pedig mRNS indukció), a CymRSV 1469 gén esetén indukál változást (amelyből 1032 mRNS kifejeződés gátlás, 437 pedig mRNS indukció). Az mRNS kifejeződés gátlása meglehetősen nagy átfedést mutatott a két vírus között (879 gén esetében közös). Ezzel szemben a TCV, amely nem indukál shut-off jelenséget, csupán 40 esetben mutatott legalább 10x-es változást (amelyből 4 mRNS kifejeződés gátlás, 36 pedig mRNS indukció). Ezek az eredmények jól korrelálnak az eddigi eredményeinkkel, és alátámasztják, hogy shut-off jelenség kialakulása a vírusfertőzés során fontos komponense lehet a tünet kialakulásnak, hiszen 1000-es nagyságrendű gének esetében okoz súlyos mRNS hiányt. Továbbá, a shut-off jelenséget kísérő markáns indukciós változások is befolyásolhatják a tünet kialakulás végső eredményét. Az előzetes eredmények azt mutatják, hogy a shut-off jelenséget mutató növények esetében transzkripciós faktorok is érintettek, azonban ezek biológiai szerepének tisztázása a folyamatban még várat magára.

"Mi teszi lehetővé a vírusok terjedését az erekben, és a levelekben, mi az oka a megfigyelt különbségnek? Hogyan történik a vírus sejtről-sejtre történő transzportja, ez aktív vagy passzív folyamat?"

A vírusok sejtről-sejtre történő mozgása a növényben aktív folyamat, amelyet a vírus által kódolt mozgásért felelős fehérje (movement protein) segít. Ez a fehérje segíti elő a vírus vagy a vírus RNS átjutását a sejteket összekötő plazmodezmákon, amelyeken egyébként nem férne át. A vírus a növény edénynyaláb rendszerébe lépve már passzív módon mozogva jut a növény távolabbi szöveteibe, majd az edénynyaláb rendszerből kilépve újabb területet foglal el. Tehát a rövid és hosszú távú mozgás minőségileg különbözik, illetve lehetséges, hogy az edénynyaláb rendszerben az RNS csendesítés nem működik hatékonyan. Ezek a faktorok lehetnek felelősek azért, hogy DI RNS jelenlétében vagy p19 defektív vírus fertőzése esetén a vírus, ha bejut az edénynyaláb rendszerbe, akkor abban képes mozogni. Az edénynyaláb rendszerből kilépés után azonban a vírus mozgása a levéllemez sejteiben megakad.

"...Ismertek-e miR168 és AGO1 transzkripció aktivitásáért felelős faktorok? Ha igen, ezek megegyeznek, vagy vannak eltérések? Van-e hasonlóság a két gén promóterjének cisz szabályozó elemei között?..."

Vaucheret és mtsai. eredményei arra utalnak, hogy növényekben az AGO1 homeosztázis fenntartásához szükséges a miR168 (mint az AGO1 mRNS-t szabályozó miRNS) és az AGO1 koexpressziója által létrehozott szabályozási visszacsatolás [1]. Az elképzelés alapján a miR168-nak és az AGO1-nek együttesen kell megjelenni a sejtekben. Az AGO1 és MIR168a promóter régióinak GUS riportergénhez történő kapcsolásával valóban meg tudták mutatni hogy, a miR168 és az AGO1 mRNS hasonlóan expresszálódik (főleg a merisztémában és a vaszkuláris rendszerben). Sőt képesek voltak ago1 hipomorf mutáns növény fenotípusát kimenekíteni olyan transzgenikus konstrukcióval, ahol az AGO1-et MIR168a gén promótere hajtotta meg. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a két promóter aktivitása között nagyfokú a hasonlóság. Az AGO1, MIR168a és MIR168b gének promótereinek összehasonlítása azonban azt mutatta, hogy ezek nukleotid sorrendje rendkívül különböző és nem lehetett nyilvánvalóan közös cisz elemeket a promóter régióban meghatározni. További kísérletek szükségesek a szabályozó faktoroknak mibenlétnek pontosabb megismeréséhez.

"... Milyen mechanizmus felelhet ezért a gátlásért? Hogyan működhet a szerzők által említett translációs gátlás? Van-e olyan mechanisztikus modell (esetleg más biológiai rendszerekből) ami a mikroRNS által közvetített translációs gátlást megmagyarázhatja?..."

Állati rendszerekben a miRNS-ek által előidézett translációs gátlás általánosan és dominánsan előforduló jelenség. Itt a miRNS-ek általában a cél mRNS 3' vég nem-kódoló régiójába kötnek be, gyakran tandem elrendeződésben, és így megakadályozzák a translációt (feltehetően elsősorban a transláció iniciációját). Ez a rendszer azonban nem vonatkoztatható automatikusan a növényi rendszerekre, mert növények esetében a miRNS-ek felismerő helye általában egy cél szekvenciára lokalizálódik és a kódoló régióban található. Brodersen és mtsai. azonban kimutatták, hogy növények esetében is előfordul miRNS mediált translációs gátlás, gyakran a miRNS indukálta hasítási szabályozás mellett [2]. Különböző miRNS cél gének vizsgálatával kimutatták, hogy az AGO1, AGO10, katanin és VARICOSE gének részt vesznek translációs gátlás előidézésében. Az AGO1 és AGO10 aktivitása korlátozott volt specifikus miRNS/cél mRNS kapcsolatokra. A translációs gátlás molekuláris mechanizmusa, a translációs apparátus és az RNS csendesítés kapcsolódása, jelenleg még pontosan nem ismert. Biokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy egyes miRNS-ek, köztük a miR168 is, a poliszómákkal asszociálódnak és az AGO1 jelenlétét is sikerült kimutatni a poliszóma frakcióban [3]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AGO1, az mRNS hasítása mellett,

valóban részt vehet a transláció gátláson keresztül történő szabályozásban is. A mi eredményeink megmutatták, hogy az AGO1 mRNS-t a miR168, a hasítás mellett, bizonyos esetekben translációs gátlással is képes szabályozni, feltehetően az AGO10 aktivitásán keresztül. Hogy pontosan, hogyan működik molekuláris szinten a miR168 közvetített translációs gátlás, és ennek van-e szerepe normál körülmények között (a növény fejlődése során) és hogyan válik el a hasítás alapú szabályozás a translációs gátlástól, ez még jelenleg nem ismert. Reményeink szerint további kísérleteink ezen a területen majd új eredményekkel járulnak hozzá a molekuláris mechanizmus mélyebb megértéséhez.

"...Miként szabályozza a p19 a miR168 felhalmozódását? Lehet-e ez közvetlen transzkripció aktiválás, vagy más mechanizmusról van szó?..."

Előzetes eredményeink alapján a p19 miR168 indukáló hatása nagyrészt független a fehérje siRNS kötő képességétől. Ez és azok az adataink, amelyek megmutatták, hogy különböző vírusokkal fertőzött növényekben egy, a miR168 prekursor érésére jellemző, RNS termék magasabb szinten van jelen, mint a nem fertőzött növényben arra utalnak, hogy a különböző vírusok által kódolt RNS csendesítés gátló fehérjék a MIR168 gén transzkripcionális aktiválásával fejtik ki hatásukat. Ezek az eredmények, azonban csak áttételesen utalnak a p19 és más RNS csendesítés gátló fehérjék a MIR168 gén transzkripcióját fokozó hatására. Jelenleg olyan transzgenikus növények vizsgálatát tervezzük a vírusfertőzések során ahol a MIR168 gének (a és b prekursorok) promóteréhez a GUS riporter gén van kapcsolva (Herve Vaucheret laborjából származó növények). Ezekkel a marker konstrukciókkal ellátott növényeket fertőzve és a GUS felhalmozódást vizsgálva reményeink szerint válasz kaphatunk arra, hogy a vírusok valóban a miR168 gén transzkripcionális aktiválásával idézik-e elő az érett miR168 fokozott felhalmozódását.

Referenciák

1. Vaucheret, H., A.C. Mallory, and D.P. Bartel, *AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1*. Mol Cell, 2006. **22**(1): p. 129-36.
2. Brodersen, P., et al., *Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs*. Science, 2008. **320**(5880): p. 1185-90.
3. Lanet, E., et al., *Biochemical Evidence for Translational Repression by Arabidopsis MicroRNAs*. Plant Cell, 2009.

Gödöllő, 2011. Október 24.

Tisztelettel,



Havelda Zoltán